из Тюкалинского района. Первичное обследование методом ОТ-ПЦР дало отрицательный результат, после трехкратного пассирования на РКЭ из патологического материала были выделены 14 изолятов вируса гриппа типа А субтипа H5N1.

Биологические и генетические особенности выделенных изолятов вирусов H5N1 в настоящее время находятся на изучении.

По данным научных учреждений занимающихся проблемами гриппа было отмечено, что все изоляты H5N1 выделенные на территории Российской Федерации во время эпизоотических вспышек, принадлежат к груше вирусов родственных вирусу гриппа, выделенного в мае 2005 г на озере Цинхай в северном Китае, и являются результатом его микроэволюции [2,3]. В связи с этим, можно предположить, что и выделенные изоляты от дикой птицы в июне месяце также принадлежат к данной группе вирусов.

Исходя из вышеизложенного, можно предположить, что изоляты вирусов гриппа субтипа H5N1, выделенные в июне 2006 года на территории Омской области, были занесены с весенней миграцией перелетных птиц на территорию Западной Сибири. Отсутствие вирулентности для диких уток вероятно является результатом адаптации вируса к данной популяции птиц на протяжении длительного периода времени.

Выделенный вирус гриппа типа А субтипа H4N6, от сороки относится к группе слабопатогенных вирусов. Повсеместно циркулирующие подобные вирусы являются также потенциально опасными для окружающей фауны, учитывая способность вируса мутировать в высокопатогенный.

Литература:

1. Львов Д.К.. Ильичев В.Д. Миграции птиц и перенос возбудителей инфекции. М., 1979.270 с.
2. Львов Д.К., Щелканов М.Ю., Дерябин П.Г Изоляция высокопатогенных (HPAI) штаммов вируса гриппа А/ H5N1 от диких птиц в очаге эпизоотии на озере Убсу-Нур (июнь 2006 г.) и их депонирование в Государственную коллекцию вирусов РФ (3 июля 2006 г.). Журн. Вопросы вирусологии. 2006,6:14-18.
3. Онищенко ГЕ, Шестопалов А.М., Терновой В.А и др. Выявление в Западной Сибири высокопатогенных H5N1 вирусов гриппа, генетически родственных вирусам, циркулирующим в Юго-восточной Азии в 2003-2005 гг. Журн. Доклады Академии наук. 2006,2 (406): 1-3.
4. Рябицев В. К. Птицы Урала, Приуралья и Западной Сибири: Справочник-определитель. Екатеринбург: Изд-во Урал, ун-та. 2002. 608 с.
5. Ellis T.M., Bousfield R.B., Bissett L A . et al. Investigation of outbreaks of highly pathogenic H5N1 avian influenza in waterfowl and wild birds in Hong Kong in late 2002. Avian Pathol. 2004 Oct; 33(5): 492-505.
6. Horimoto T, Kawaoka Y. Influenza: iessions from past pandemics, warnings from current incidents. Nat Rev Microbiol. 2005,3 (8): 591-600.
7. Liu M. et al. The influenza virus gene pool in a poultry market in south central China //Virology 2003. V 305. N 2. P. 267-275
8. Kou Z., Lei EM., Yu J. et al. New genotype of avian influenza H5N1 viruses isolated from tree sparrows in ChinaJ Virol. 2005 Dec; 79(24):15460-6.
9. Kwon Y.K., Joh S.J., Kim M.C. et al. Influenza in magpies (Pica pica sericea) in South Korea. J Wild Dis. 2005 Jul;41(3): 618-623
10. Normil D. Avian influenza. Potentially more lethal variant hits migratory birds in China. Science. 2005, 309(5732): 231.
11. Suarez D.L. Evolution of avian influenza viruses // Vet. Microbiol. 2000. V 74. E 15-27
12. The National Training Course on Animal Influenza Diagnosis and Surveillance. Harbin, 2001.79 p.
13. Webster R.G., Bean WJ,, Gorman O.T. et al. Evolution and ecology of influenza A viruses. Microbiol Rev. 1992,56:152-179.

УДК 619:611.018.54:591.111

Р.Я. Гильмутдинов, Н.И. Гурьянов, И.М. Ганиев

(ФГУ «Федеральный Центр токсикологической и радиационной безопасности животных» (г. Казань))

ВЛИЯНИЕ КОМБИНАЦИИ СЫВОРОТОК КРОВИ РАЗЛИЧНЫХ ВИДОВ ЖИВОТНЫХ НА ПРОЛИФЕРАТИВНУЮ АКТИВНОСТЬ КУЛЬТУР КЛЕТОК И РЕПРОДУКЦИЮ ВИРУСОВ

При культивировании клеток животных для вирусологических целей обычно используется сыворотка крови крупного рогатого скота, реже - лошадей, свиней, кроликов и других видов. У них имеются как преимущества, так и недостатки, что связано в первую очередь с биохимическим составом. Так, интенсивность пролиферации клеток зависит от содержания в среде культивирования одновременно низко- и высокомолекулярных компонентов сыворотки (Адаме Р, 1985; Конки Д. и др., 1989; Рян-

Таблица 1

Результаты определения показателей качества сывороток крови различных видов животных

№ п/п	Сыворотки крови и их комбинации	Прозрачность, ед. опт. плот.	pH	Общий белок, г/л	Общие липид, г/л	Свободн. гемоглобин, мт%	Общий холестерин, мМ/л
1	СКВ	0,226 ±0,01	7,63 ±0,02	58,4 ± 2,08	1,75 ±0,16	49,8 ±0,95	0,90 ±0,01
2	СКБ+СКЛ (3:1)	0,231 ±0,01	7,65 + 0,01	56,7 ± 0,99	1,58 ±0,18	44,9 ±1,98	0,82 ±0,03
3	СКБ+СКЛ (1:1)	0,248 + 0,01	7,64 ±0,01	55,7 ± 1,34	1,54 ±0,13	43,5 + 1,10	0,74 ±0,02
4	СКБ+СКЛ (1:3)	0,264 ±0,01	7,71 ±0,01	58,2 + 0,82	1,48 ±0,09	40,4 ± 1,90	0,74 ±0,03
5	СКС	0,364 ±0,01	758 ±0,01	69,5 ±3,34	1,70 + 0,26	44,9 + 1,98	0,88 ±0,02
6	СКС+СКБ (3:1)	0,327 ±0,01	7.59 ± 0,01	64,6 ± 4,82	1,71 ±0,14	45,8 ±1,91	0,82 ±0,03
7	СКС+СКБ (1:1)	0,293 ±0,01	7,59 ±0,01	62,1 ± 1,67	1,75 ±0,13	46.2 ±1,10	0,86 ±0,04
8	СКС+СКБ (1:3)	0,252 + 0,01	7,59 + 0,02	58,6 ± 1,89	1,74 ±0,07	47,1 + 2,52	0,83 ±0,04
9	СКЛ	0,236 + 0,01	7,63 ± 0,01	56,2 ± 1,75	1,29 ±0,08	35,4 ±1,45	0,74 ±0,06
10	СКЛ+СКС (3:1)	0,270 + 0,01	7,61 ±0,01	58,8 ± 0,20	1,50 ±0,16	39,9 ±2,20	0,78 ±0,04
11	СКЛ+СКС (1:1)	0,295 ±0,01	7,61 ±0,02	63,2 ± 3,32	1,44 ±0,13	39,0 ±1,91	0,75 + 0,05
12	СКЛ+СКС (1:3)	0,351 + 0,02	7,55 + 0,01	64,7 ± 4,39	1,52 ±0,18	40,8 ±1,98	0,75 ±0,03

ский А.Л., 2001: Laino P., Mondino В., 1976; Nemeskery A. et al., 1976).

С учетом изложенного, нами изучена возможность использования комбинированных сывороток крови основных видов сельскохозяйственных животных, а именно коров, лошадей и свиней с целью повышения эффективности культивирования клеток и репродукции на них вирусов.

Нам известен лишь один пример (Hedy С, Curry К., 1986) применения комбинированных сывороток: 10 % сыворотки крови плодов коров и 90 % сыворотки крови крупного рогатого скота, хотя следует отметить, что сыворотки крови, входящие в данную комбинацию, принадлежат к одному виду животных.

Эффективность размножения вирусов в культуре клеток зависит от ряда факторов: линий культур клеток, их скорости роста и пролиферации; особенностей сыворотки крови, входящей в состав питательной среды и др. Кроме того, известно, что использование гетеровидовых сывороток крови в питательной среде повышает репродукцию вирусов на культурах клеток за счет отсутствия в сывороточном компоненте антител к данным вирусам (Гумеров В.Е, Хаертынов К.С, 1987).

В настоящей работе использованы 3 серии сывороток крови бычков (СКБ), лошадей (СКЛ) и свиней (СКС), полученные на ОАО «Казанский мясокомбинат» (по методике Гурьянов Н.И., 1992). Изучена ростстимулирующая активность этих сывороток и их комбинаций: СКБ и СКЛ, СКБ и СКС, СКЛ и СКС в соотношениях 3:1,1:1,1:3.

Исследования проведены на перевиваемых культурах клеток SPEV (почка эмбриона свиньи), MDBK (почка эмбриона крупного рогатого скота) HTR (трахеяэмбриона крупного рогатого скота). В качестве основы культуральной среды использована среда Игла-МЕМ с добавлением 10% сывороток крови животных и их комбинаций. Клеточную взвесь рассевали по 2 мл во флаконы емкостью 10 см^3 с посевной площадью 3 см^3, подсчет клеток проводили после 48 и 72 часовой инкубации при температуре 37° С. Клетки снимали со стекла раствором трипсина-версена (1:3), наливая в каждый флакон по 3 мл, после чего подсчитывали в камере Еоряева.

Инфекционную активность вирусов ИРТ и ПГ-3 изучали, пассируя на клетках MDBK иТЫ, соответственно, с посевной концентрацией 200 000 клеток/мл при выраитивании на культуральной среде, содержащей вышеуказанные сыворотки и их сочетания. В последующем полученный вирусный материал оттитровывался на этих же культурах клеток, выращенных на среде с использованием

Таблица 2

Пролиферативная активность отдельных культур клеток при использовании различных комбинаций сывороток крови

№ п/п	Сыворотки крови и их комбинации	Культура клеток					
		SPEV		MDBK		TR	
		48 ч,	72 ч.	48 ч.	72 ч.	48 ч.	72 ч.
1	СКБ	3,22 ±0,13	3,83 ±0,14	4,47 ±0,13	5,64 ±0,16	3,02 + 0,08	3,61 ±0,11
2	СКБ + СКЛ (3:1)	3,41 ±0,13	4,10 ±0,14			3,20 ±0,08	3,89 ±0,08
3	СКБ + СКЛ (1:1)	3.53 ±0,13	4,22 ±0,14	4,52 ±0,13	5,35 • + 0,13	3,48 ±0,06	4,27 ±0,12**
4	СКБ + СКЛ (1:3)	3,29 ±0,11	3,91 ±0,14			3,42 ± 0,08*	4.09 ± 0,14*
5	СКС	3,62 ±0,13	4,38 ±0,17	4,68 ±0,14	5,64 ±0,13	3,12 ±0,06	3,71 + 0,11
6	СКС + СКБ (3:1)	3.88 + 0,12*	4,54 ± 0,18*			3,63 ±0,10**	4,72 ±0,11**
7	СКС + СКБ (1:1)	4,00 ± 0,15*	4,64 ± 0,16*	5,01 ±0,14*	6.00 ±6,17	3,69 ±0,11**	4,85 ±0,11**
8	СКС + СКБ (1:3)	3,77 ± 0,14*	4,49 + 0,17*			3,58 ±0,07**	4,43 +0,11**
9	СКЛ	3,11 ±0,12	3,74 ±0,16	3,99 ±0,11*	4,95 ±0,14**	2,83 ±0,10	3,33 ±0,07
10	СКЛ + СКС (3:1)	4,08 ±0,15**	4,62 ±0,16*			4,18 ±0,11**	5,26 ±0,14**
11	СКЛ + СКС (1:1)	4,33 +0,15**	5,36 ±0,18**	5,21 +0,12**	6,29 ±0,18*	4,79 +0,14**	5,78 ±0,15**
12	СКЛ + СКС (1:3)	4,21 +0,15**	4,99 +0,18**			4,27 ±0,11**	5,53 ±0,12**

Примечание: * и ** - уровни достоверности различия с контролем $p < 0,01$ и $p < 0,001$ соответственно.

Таблица 3

Инфекционная активность вирусов ИРТ и ПГ-3 на перевиваемых линиях культур клеток MDBK и TR

Сыворотки крови и их комбинации	Культура клеток	
	MDBK	TR
	Титр вируса lg ТЦЦ$_{50}$, мл	
	ИРТ	ПГ-3
СКБ	5,6 + 0,2	5,3 ± 0,2
СКЛ	5,5 ±0,1	5,1 + 0,1
СКС	6,1 ±0,1	5,8 ± 0,2
СКБ + СКЛ (1:1)	4,8 ± 0,2	5,2 + 0,1
СКБ + СКС (1:1)	6,6 ± 0,1	6,3 ± 0,2
СКЛ + СКС (1:1)	6,5 ± 0,1	6,1 ± ОД

Примечание: ТЦД$_{50}$, мл тканевая цитопатическая доза вируса

бычьей сыворотки крови.

Различными авторами показана зависимость белкового состава сыворотки крови от возраста, породы и пола животных, его физиологического состояния, продуктивности, типа нервной деятельности, кормления, температуры окружающей среды и сезона года. По этой причине все перечисленные параметры мы унифицировали с целью устранения их влияния.

Сыворотки крови должны соответствовать определенным требованиям по ряду физико-химических и биохимических показателей (Методические рекомендации по контролю качества жидкой сыворотки крови крупного рогатого скота, применяемой в медицинских и биологических целях, 1982) и для их соблюдения мы провели предварительное определение данных показателей (табл. 1),

Из таблицы 1 видно, что по исследованным показателям (содержание свободного гемоглобина, общих липидов, общего белка, в том числе общего холестерина, а так-

же прозрачность и pH) рассмотренные сыворотки близки к предъявляемым требованиям,

Результаты исследований пролиферативной активности культур клеток SPEY MDBK и TR после 48- и 72-часового выращивания представлены в таблице 2.

Согласно таблице 2, высокий индекс пролиферации наблюдается при использовании комбинации сывороток крови СКЛ и СКС в соотношении 1:1 у всех исследованных культур клеток после 72-х часового вьфащивания (MDBK - 6,29±0,18; TR - 5,78±0Д5 и SPEV - 5.36±0Д8).

Результаты опытов по определению инфекционной активности вирусов ИРТ и ПГ-3 представлены в таблице 3.

Анализ представленных в таблице 3 данных свидетельствует, что оптимальными для репродукции вирусов ИРТ и ПГ-3 на культурах клеток MDBK и TR являются комбинации сыворотки крови свиной с бычьей (6,6±0,1 и 6,3±0,2) и лошадиной (6,5+0,1 и 6,1+0,1) при соотношении их 1:1.

Таким образом, применение комбинированных вариантов сывороток в культуральных средах способствует повышению пролиферативной активности перевиваемых линий культур клеток, в частности SPEY MDBK и TR, а также репродуктивной активности выращиваемых на них вирусов (на примере вирусов ИРТ и ПГ-3), что позволяет получать вирусную массу с высокой инфекционной активностью при изготовлении диагностических и профилактических препаратов.

SUMMARY

Use of serum of animals in a combination in nutrient mediums improves growth and proliferation ceils cultures and a reproduction of viruses on them, which, undoubtedly, is connected to expansion of variety growth factors at mixing serum of different species.

Литература:

1. Адаме Е Методы культуры клеток для биохимиков: Пер. с англ. - М.: Мир. 1983. - 264 с.
2. Гумеров В.Е, Хаертъшов К.С. Возможность использования гетерогенных сывороток для изучения чувствительности культур клеток к вирусу инфекционного ринотрахеита (ИРТ) //Тез. докл. 3-ей Всес. конф. Научные основы технологии иромышл. произв-ва вет. биол. препаратов. М., 1987 - с.17 -18.
3. Гурьянов Н.И. Усовершенствование технологий получения сывороток крови кур, бычков, эмбрионов коров и изучение их свойств при культивировании клеток и вирусов: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. - Казань, 1992. -19 с.
4. Конки Д., Эрба Э., Фрелини Е и др. Культуры животных клеток. Методы: Пер. с англ. - М.: Мир. 1989.-333 с.
5. Методические рекомендации по контролю качества жидкой сыворотки крови крупного рогатого скота применяемой в медицинских и биологических целях. Мю - 1982. - 25с.
ft. Рянский А.Л. Сравнительное исследование трипсина различных фирм используемого для получения первичной культуры клеток,// Тезисы докладов Всероссийской научной конференции 14 -15 февраля 2001 г.- М., 2001. - с. 217.
7. Hedy С, Curry К. // Patent № 4520107, MK13 С 12 № 5/00,1/38; A 61 К 35/14; С 07 G 7/00 (USA), 1986.
8. Laino P., Mondino B. Organ cultures of human corneas. // Bull. N. X Acad. Med. - 1976. - Vol. 52. - № 2.-E 216-221.
9. Nemeskery A., Nemeth A., Setalo Cy. Cell differentiation of the fetal rat interior pituitary in vitro. // Cell and Tissue Res. - 1976. - Vol. 170. - № 2. - E 263 - 273.

УДК: 619:615.918:615.279+573.6:619

М.В. Тертичная, Р.Я. Гильмутдинов

(ФГУ «Федеральный Центр токсикологической и радиационной безопасности животных» (г. Казань))

ВОЗДЕЙСТВИЕ НТ-2 ТОКСИНА НА КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК РАЗЛИЧНЫХ ВИДОВ ЖИВОТНЫХ

В современных биологии, медицине и ветеринарии вопросы этического, разумного и экономного использования животных в эксперименте привлекают все большее внимание специалистов и общественности (Еропкин М.Ю., 1999; Еськов А.П. и др., 2003; Botham P., Lewis R., 1996 и т.д.). Альтернативой их использованию являются перевиваемые культуры животных клеток (Червонская ГП. и др., 1998; Лукьянов А.С. и др., 1996; Balls M. et al., 1998 и т.д.).

Известно, что основным метаболитом при взаимодействии Т-2 токсина с организмом животных является НТ-2 токсин. Аналогичная ситуация имеет место, очевидно, и в КК. Так, в исследованиях Trusal L. (1986) и Yagen B. et al. (1991) было установлено, что в течение 1,5 часов до 30% Т-2 токсина метаболизировалось КК в НТ-2 токсин, в меньшем количестве обнаруживались Т-2 триол и Т-2 тетраол, причем количество метаболитов в процессе инкубации нарастало.